

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 327 682 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
16.07.2003 Patentblatt 2003/29

(51) Int Cl.7: **C12N 15/10, C12N 15/11,
C12P 19/34**

(21) Anmeldenummer: **02000720.9**

(22) Anmeldetag: **11.01.2002**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(71) Anmelder: **BioSpring Gesellschaft für
Biotechnologie mbH
60386 Frankfurt (DE)**

(72) Erfinder:
• **Aygün, Hüseyin
60322 Frankfurt am Main (DE)**

- **Kircher, Markus, Dr.
60318 Frankfurt am Main (DE)**
- **Rosmus, Susann, Dr.
60318 Frankfurt am Main (DE)**
- **Wojczewski, Sylvia, Dr.
65812 Bad Soden (DE)**

(74) Vertreter: **Keller, Günter, Dr. et al
Lederer & Keller
Patentanwälte
Prinzregentenstrasse 16
80538 München (DE)**

(54) Verfahren zur Herstellung von DNA

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von DNA, das umfasst, daß man n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei das zweite bis n-te Basis-DNA-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert ist und n wenigstens 2 ist; wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die als Ligationsmatrize für die Basis-DNA-Oligonukleotide fungieren können; die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in

Kontakt bringt; das daraus resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterwirft; und schließlich das daraus hervorgehende Reaktionsprodukt einer Exonukleasereaktion unterwirft, wobei der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt. Die Erfindung betrifft auch durch das Verfahren erhältliche DNA sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

EP 1 327 682 A1

BEST AVAILABLE CO

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren auf dem Gebiet der Nukleinsäuresynthese. Derzeit gibt es zahlreiche Verfahren zur Synthese von einzelsträngiger bzw. doppelsträngiger DNA (vgl. Figur 1A und 1B).

[0002] Die einfachste Art einer Einzelstrangsynthese besteht im chemischen Aufbau einzelsträngiger DNA. Entsprechend kann auch doppelsträngige DNA generiert werden, indem nach chemischer Synthese von Strang (+) bzw. Gegenstrang (-) eine Hybridisierung beider Stränge durchgeführt wird. Diese Technik stößt jedoch sehr schnell an ihre Grenzen. Mit den Standardverfahren der DNA-Synthese können selten Längen von über 150 Basen aufgebaut werden. Hinzu kommen Abbrüche und Verkürzungen, die sich nur über sehr aufwendige Reinigungsverfahren (Gelelektrophorese) wirkungsvoll von dem Hauptprodukt abtrennen lassen.

[0003] Die Vervollständigung einzelsträngiger DNA zu einem Doppelstrang lässt sich auch auf enzymatischem Weg realisieren. Hierbei können beispielsweise Außenprimer verwendet werden, die gezielt den Zwischenbereich in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren. Bei einer anderen Technik werden längere Oligonukleotide an ihrem 3' Ende mit Hairpinmustern ausgestattet, die sich selbstkomplementär zusammenlagern und damit als "intramolekularer" Primer für eine enzymatische Verlängerung dienen (Uhlmann, 1987; siehe auch Figur 1B, Nr. 8).

[0004] Längere Oligonukleotide sind auch die Grundlage einer weiteren Technik, bei der vollständig überlappende Oligonukleotide, also ein Doppelstrang, mittels spezifischer Primer in einer PCR aufgefüllt werden (Ciccarelli, 1991; siehe auch Figur 1B, Nr. 9).

[0005] Die Verwendung der bisher beschriebenen Techniken wird jedoch durch die Länge der eingesetzten Oligonukleotide eingeschränkt. Eine Erweiterung der Gensynthese auf größere Genabschnitte kann durch den Aufbau von sogenannten Genkassetten erreicht werden (US 4 652 639, US 6 083 726; siehe auch Figur 1A, Nr. 1 und 2). Solche Genkassetten bestehen aus kurzen, doppelsträngigen DNA Fragmenten, die entweder spezifische Überhänge von 3 bis 7 Basen (sticky end) oder auch glatte Enden (blunt end) mit 5' Phosphatgruppen tragen können. Überhänge haben dabei den Vorteil, dass durch eine definierte Auswahl solcher bei einer enzymatischen Ligation mehrere Fragmente gleichzeitig zu einem Gen kombiniert werden können. Der Aufbau dieser Kassetten erfolgt wiederum über Einzelstrangsynthese mit anschließender Hybridisierung von Strang (+) und Gegenstrang (-). Die 5' Phosphatgruppen werden vor Hybridisierung über Nukleotidkinasen an das Oligonukleotid angehängt. Durch die geringe Ligationseffizienz ist man bei der Verwendung einer solchen Strategie häufig auf eine Zwischenklonierung einzelner Genfragmente angewiesen (Ferretti, 1986). Zudem bereitet bei einer solchen Technik der Einsatz von degenerierten Oligonukleotiden, beispielsweise zum Aufbau von DNA Bibliotheken, große Schwierigkeiten.

[0006] Einfacher sind Reaktionen, die sequentielle Verlängerungstechniken auf PCR-Basis einsetzen (Ausubel, 1994; Jayaraman, 1991; Chang, 1993; Dillon, 1990; Jayaraman, 1992; Ye, 1992). Hierzu gehört beispielsweise eine Synthesetechnik, die 1997 von Casimiro beschrieben wurde (Casimiro, 1997; siehe auch Figur 1B, Nr. 12). In dieser Technik wird sukzessive doppelsträngige DNA generiert, indem lange einzelsträngige Oligonukleotide mit komplementären Enden über PCR amplifiziert werden und somit als Matrizen ("templates") für verlängernde PCR-Reaktionen dienen können. Ein wesentlicher Nachteil einer solchen Strategie besteht in der Akkumulation von Mutationen durch die Verwendung zu hoher Zyklenzahlen in der PCR. Bei der rekursiven Gensynthesestrategie (Dillon, 1990; Ausubel, 1994; Traub, 2001; siehe auch Figur 1B, Nr. 10) werden die zu synthetisierenden Gene als zueinander versetzt überlappende, Strang (+) und Gegenstrang (-) Oligonukleotide aufgebaut. In einer anschließenden PCR können die freien 3'-Enden solcher Oligonukleotide als Primer zur Synthese des komplementären Strangabschnittes eingesetzt werden. Da sich nach jeder Verlängerung wieder neue Anlagerungsmöglichkeiten für flankierende Sequenzen ergeben, lassen sich so Zyklus-für-Zyklus vollständige Gene synthetisieren. In einer etwas abgewandelten Form, kommt diese Strategie auch bei einem anderen Verfahren zum Einsatz. Hier verzichtet man auf die Verwendung besonders langer Oligonukleotide zur Verlängerung des Gens und arbeitet stattdessen mit kleineren Übergangsstücken, die die einzelnen Genfragmente miteinander verbinden. Diese Übergangsstücke fungieren gleichzeitig in der PCR als Primer, die den komplementären Gegenstrang entsprechend aufbauen (Jayaraman, 1992; siehe auch Figur 1A, Nr. 11). Genau wie bei Casimiro (Casimiro, 1997), besteht auch hier ein wesentlicher Nachteil in der Akkumulation von Mutationen durch die Verwendung zu hoher Zyklenzahlen in der PCR. Weiterhin verhindern die einzelnen doppelsträngigen Fragmente eine effiziente Amplifikation des Vollängenproduktes, da sie bedingt durch ihre Länge bei wesentlich höheren Temperaturen mit der Matrize hybridisieren als die PCR-Außenprimer.

[0007] In wiederum anderen Gensynthesestrategien steht der Einsatz von Ligasen im Vordergrund (Sproat, 1985; Ferretti, 1986; Hostomsky, 1987; Wosnick, 1989; Climie, 1990; Oprian, 1991). Bei der TDL-Technologie ("template directed ligation") werden Oligonukleotide mit 5'-Phosphatgruppen an einen bereits vorhandenen Einzelstrang hybridisiert und anschließend enzymatisch zu Oligonukleotidpolymeren verknüpft (WO 0058517, US 6 110 668; siehe auch Figur 1A, Nr. 3). Ein solcher Gegenstrang lässt sich entweder durch vorherige Exonukleasebehandlung eines entsprechenden Wildtyp-templates oder aus einer asymmetrischen PCR zur Verfügung stellen. Diese Gensynthesestrategie ist jedoch auf die Erzeugung bzw. Reproduktion von homologen Genen begrenzt. Mit Hilfe der T4-DNA Ligase lassen sich auch Paare von Oligonukleotiden mit Hilfe deutlich kürzerer Übergangsstücke miteinander verknüpfen (US 5 158

877; siehe auch Figur 1A, Nr. 5). Eine solche Ligation setzt auch hier eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des stromabwärts (zum 3'-Ende hin) gelegenen Oligonukleotides voraus. Eine Variante dieses Verfahrens geht von einer deutlich höheren Anzahl einzelsträngiger Oligonukleotide aus, die schließlich in einem gemeinsamen Ligationsschritt durch die T4-DNA Ligase miteinander verknüpft werden (Chen, 1990; Figur 1A, Nr. 6). Eine solche Ligation lässt sich entweder in einem Schritt (all-in-one) oder aber auch sequentiell durchführen. Ein Nachteil bei den Einzelstrangtechniken ist das Fehlen eines Gegenstranges zur entsprechenden Klonierung in Vektoren. Chen et al. konnten jedoch zeigen, daß die direkte Klonierung von Einzelsträngen in zuvor geöffnete Vektoren durchaus möglich ist. Die Verwendung von T4-DNA Ligasen schränkt zudem die Ligationsbedingungen auf Temperaturen um 37°C ein. Dadurch können Sekundärstrukturen, die bei langen, einzelsträngigen Oligonukleotiden häufig entstehen, die Ligation nachteilig beeinflussen.

[0008] Andere Gensynthesestrategien kombinieren die Vorteile aus Ligase- bzw. Polymerasebasierenden Teilschritten (Au, 1998; Chalmers, 2001; siehe auch Figur 1A, Nr. 7). Die von Au et al. vorgestellte Synthesestrategie (Au, 1998) geht von zueinander komplementären Oligonukleotiden aus (um 40 Nukleotide), die zunächst mit Hilfe thermostabiler Ligasen (Pfu-DNA Ligase) in einer Ligase-Kettenreaktion (LCR) zu doppelsträngigen Teilfragmenten kombiniert werden. Diese Fragmente werden anschließend isoliert und über PCR neu miteinander kombiniert.

[0009] Von diesen sich in Lösung abspielenden Reaktionen weichen Techniken ab, die den Aufbau von Genen auf fester Phase (z.B. auf Beads) als Grundlage haben (US6083726, WO9517413; siehe auch Figur 1A, Nr. 4). Eine Verknüpfung mit einer solchen Phase kann entweder über die terminale Modifikation von DNA mit hochaffinen Bindungsmolekülen (Biotin, Digoxigenin) oder mit funktionalen Gruppen (NH₂, COOH, SH) erreicht werden. Diese Synthesestrategien haben den großen Vorteil, dass Fragmente, die bei einer Ligation nicht eingebaut werden, bei den anschließenden Waschschritten entfernt werden können. Der sequentielle Aufbau größerer Gene kann, basierend auf einer solchen Festphasenstrategie, entweder chemisch (z.B. über 5'Iod- bzw. 3'Thiophosphatmodifizierte Oligonukleotide) oder enzymatisch z.B. durch repetitiven Verdau mit Alw261 (US 6 083 726) erfolgen. Beim enzymatischen Aufbau wird die T4-DNA Ligase, zur blunt end bzw. sticky end Ligation der doppelsträngigen Genfragmente oder die T4-RNA-Ligase zur Ligation der einzelsträngigen Oligonukleotide verwendet (WO 9517413).

[0010] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von DNA zur Verfügung zu stellen.

[0011] Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch eine Exonukleasereaktion nach Ligation an scharnierartigen Übergangsstücken das gewünschte Produkt oder Zwischenprodukt besonders angereichert und/oder selektiert werden kann.

[0012] Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von DNA, das eine matrizenabhängige Ligation ("template directed ligation") an Übergangsstücken und eine nachfolgende Exonukleasereaktion umfaßt.

[0013] Ein erster Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von DNA, das umfasst, daß man

a) n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei

- i) das zweite bis n-te Basis-DNA-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert ist und
- ii) n wenigstens 2 ist;

b) wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, wobei für die Scharnier-DNA-Oligonukleotide gilt, daß der 3'-terminale Bereich eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 3'terminalen Bereich eines Basis-DNA-Oligonukleotids ist, und der 5'-terminale Bereich desselben Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 5'-terminalen Bereich des unmittelbar darauffolgenden Basis-DNA-Oligonukleotids ist, so daß im Falle der Hybridisierung eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden ein im Bereich des Scharnier-DNA-Oligonukleotids doppelsträngiges DNA-Hybrid entsteht;

c) die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in Kontakt bringt;

d) das aus Schritt c) resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterwirft;

e) das Reaktionsprodukt aus Schritt d) einer Exonukleasereaktion unterwirft, wobei der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts aus Schritt d) wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt.

[0014] In einem ersten Schritt des Verfahrens werden n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei n wenigstens 2 ist. Die Zahl n ist vorzugsweise 3 bis 100, bevorzugter 5 bis 50, am bevorzugtesten 7 bis 25.

[0015] Der Ausdruck "Oligonukleotid" in dieser Anmeldung -bedeutet keine besondere Einschränkung bezüglich der

Länge des Oligonukleotids. Die Basis-DNA-Oligonukleotide haben üblicherweise eine Länge von 45 bis 1000 Nukleotiden, bevorzugt von 50 bis 500, bevorzugter von 75 bis 300, am bevorzugtesten von 100 bis 150 Nukleotiden. Die Basis-DNA-Oligonukleotide können auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Üblich ist es aber, zur Herstellung die Phosphoramidit-Methode zur Synthese von Oligonukleotiden einzusetzen. Einzelheiten dieser Synthesemethode und zur Durchführung geeignete Vorrichtungen sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise Beaucage, S.L. & Iyer, R.P. (1993) Tetrahedron, 49 (28), 6123-6194; Caruthers, M.H. et al. (1987) Methods in Enzymol., 154, 287-313; Beaucage, S.L. & Caruthers, M.H. (1981) Tetrahedron Lett. 22 (20), 1859-1862 entnommen werden.

[0016] Das "erste" Basis-DNA-Oligonukleotid ist das in der herzustellenden DNA am meisten 5' gelegene Basis-DNA-Oligonukleotid, bezogen auf den Strang, dessen Sequenz der Sequenz des Basis-DNA-Oligonukleotids entspricht. Die Sequenz des "zweiten" Basis-DNA-Oligonukleotids schließt sich unmittelbar an das 3'-Ende des "ersten" Basis-DNA-Oligonukleotids an. Das "n-te" oder "letzte" Basis-DNA-Oligonukleotid ist das in der herzustellenden DNA am meisten 3' gelegene Basis-DNA-Oligonukleotid, bezogen auf den Strang, dessen Sequenz der Sequenz des Basis-DNA-Oligonukleotids entspricht.

[0017] Die Basis-DNA-Oligonukleotide mit Ausnahme des ersten Basis-DNA-Oligonukleotids sind am 5'-Ende phosphoryliert. Dies ist für die spätere Ligation erforderlich. Die Phosphorylierung kann nach der Synthese der Oligonukleotide in einer separaten Reaktion erfolgen. Bevorzugt ist es aber, die Phosphorylierung unmittelbar am Ende der Oligonukleotidsynthese im DNA-Synthesizer durchzuführen. Die Durchführung dieser Methode ist dem Fachmann bekannt.

[0018] In einem weiteren Schritt des Verfahrens werden wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt. Die Scharnier-DNA-Oligonukleotide haben in der Regel eine Länge von 8 bis 300 Nukleotiden, bevorzugt von 10 bis 100, bevorzugter von 16 bis 70 Nukleotiden, am bevorzugtesten von 20 bis 40 Nukleotiden. Auch die Scharnier-DNA-Oligonukleotide werden vorzugsweise durch die Phosphoramidit-Methode hergestellt.

[0019] Scharnier-DNA-Oligonukleotide sind Oligonukleotide, die durch Hybridisierung mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden zu einem DNA-Hybrid führen können, das einen doppelsträngigen und zwei einzelsträngige Bereiche aufweist. Das Scharnier-DNA-Oligonukleotid erfüllt damit die Funktion einer Ligationsmatrize, da es zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Basis-DNA-Oligonukleotide räumlich zueinander führt, so daß unter geeigneten Bedingungen eine Ligation erfolgen kann. Der 3'-terminale Bereich eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids ist also wenigstens teilweise komplementär zum 3'-terminalen Bereich eines bestimmten Basis-DNA-Oligonukleotids, und der 5'-terminale Bereich desselben Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 5'-terminalen Bereich des unmittelbar darauffolgenden Basis-DNA-Oligonukleotids, so daß im Falle der Hybridisierung eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden ein im Bereich des Scharnier-Oligonukleotids doppelsträngiges DNA-Hybrid entsteht.

[0020] Die Komplementarität muß nicht 100% sein, sie muß aber ausreichen, um eine Hybridisierung unter geeigneten Bedingungen zu gewährleisten. Bevorzugt ist eine Identität von wenigstens 95 %. In einer besonderen Ausführungsform ist die Komplementarität 100 %.

[0021] Die Länge des mit einem bestimmten Basis-DNA-Oligonukleotid hybridisierenden Bereichs eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids hängt in erster Linie von der Gesamtlänge des Scharnier-DNA-Oligonukleotids ab. Üblicherweise kann die 5'-terminale Hälfte eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit dem einen Basis-DNA-Oligonukleotide hybridisieren, die 3'-terminale Hälfte des Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit einem anderen. Es kann aber durchaus eine Abweichung von dieser hälftigen Aufteilung gegeben sein.

[0022] In einer besonderen Ausführungsform sind die Scharnier-DNA-Oligonukleotide so modifiziert, daß sie am 3'-Ende nicht enzymatisch verlängert werden können, z. B. durch DNA-Polymerasen.

[0023] In einem dritten Schritt des Verfahrens werden die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in Kontakt gebracht. Dies erfolgt unter solchen Bedingungen, daß Hybridisierungen zwischen dem oder den Scharnier-DNA-Oligonukleotid(en) und den Basis-DNA-Oligonukleotiden stattfinden können.

[0024] In einem weiteren Schritt wird das aus dem vorhergehenden Schritt resultierende DNA-Hybrid einer Ligation unterworfen. Dieser Schritt kann auch im wesentlichen gleichzeitig mit dem dritten Schritt zusammen vorgenommen werden, d. h. die verschiedenen Oligonukleotide werden einfach zusammen mit den Ligationreagenzien gemischt und unter solchen Bedingungen inkubiert, daß eine Ligation stattfinden kann.

[0025] Es können verschiedene Enzyme mit Ligase-Aktivität zur Ligation eingesetzt werden, beispielsweise T4-DNA-Ligase, die in einem Temperaturbereich von 16°C bis 37°C die höchste Aktivität aufweist. Es hat sich aber als besonders vorteilhaft herausgestellt, eine thermostabile Ligase zu verwenden. Dadurch können selbst bei langen Basis-DNA-Oligonukleotiden (mit einer Länge >150 Nukleotide) bei erhöhter Temperatur noch gute Ligationsausbeuten erhalten werden. Bevorzugte Enzyme sind *Taq* DNA-Ligase und *Pfu* DNA-Ligase.

[0026] Wesentlich für das erfindungsgemäße Verfahren ist, daß das Reaktionsprodukt der Ligationsreaktion in einem fünften Schritt einer Exonukleasereaktion unterworfen wird. "Exonuklease" im Sinne dieser Anmeldung ist ein Enzym, das Nukleotide sequenziell von freien Enden eines linearen Nukleinsäuresubstrats abspaltet. Im Gegensatz dazu spaltet eine "Endonuklease" das Nukleinsäuresubstrat an internen Stellen der Nukleotidsequenz.

[0027] Diese Reaktion kann sich unmittelbar an die Ligation anschließen, es ist aber auch denkbar, daß zwischen Ligation und Exonuklease-Behandlung Zwischenschritte erfolgen. Das Reaktionsprodukt der Ligation kann nach der Ligation isoliert oder angereichert werden, beispielsweise durch Fällung der DNA. Es ist aber auch denkbar, daß das Reaktionsgemisch im wesentlichen unverändert der Exonuklease-Behandlung unterworfen wird.

[0028] Zur Exonuklease-Behandlung werden Enzyme mit Exonuklease-Aktivität eingesetzt. Möglich sind beispielsweise Exonuklease VII, allgemein Exonukleasen, bevorzugt Exonuklease VII, jedoch auch Exonuklease I, Exonuklease III und Exonuklease V als auch DNase I sowie Mischungen der soeben beschriebenen Hydrolasen.

[0029] Der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts enthält wenigstens 2 Cap-Strukturen. Eine "Cap-Struktur" im Sinne dieser Anmeldung ist eine Struktur, die einem Ende einer linearen Nukleinsäure Resistenz gegen eine Exonuklease verleiht. Dadurch ist die zu synthetisierende gewünschte DNA-Sequenz vor Nukleaseabbau geschützt. Eine erste Cap-Struktur liegt im 5'-terminalen Bereich der zu synthetisierenden DNA-Sequenz, eine weitere Cap-Struktur liegt im 3'-terminalen Bereich der zu synthetisierenden DNA-Sequenz.

[0030] Die Cap-Struktur kann, muß aber nicht am unmittelbaren 5'-bzw. 3'-Ende des durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildeten DNA-Strangs des Reaktionsprodukts liegen. Die Erfindung umfaßt auch den Fall, daß ein oder zwei Enden dieses Stranges Nukleotide aufweisen, die nicht gegen Exonuklease-Abbau geschützt sind. Wesentlich ist, daß die gewünschte DNA-Sequenz durch Cap-Strukturen geschützt ist. Es ist also auch der Fall umfaßt, daß durch Basis-DNA-Oligonukleotide an den Enden des entstehenden DNA-Strangs Nukleotide eingeführt werden, die nicht in der gewünschten DNA-Sequenz enthalten sein müssen. Derartige Nukleotide müssen nicht gegen Nukleaseabbau geschützt sein.

[0031] Dem Fachmann sind verschiedene Cap-Strukturen bekannt. Beispiele dafür sind Thioatbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden, 2'-OMethyl-RNA, modifizierte Basen, DNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en) und/oder RNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en). Basenmodifikationen, die Schutz gegen Exonuklease-Abbau verleihen, sind C-5 Propinyl bzw. C-5 Methyl modifizierte Basen, 2-Amino-2'-deoxy Adenin, N-4-Ethyl-2'-deoxy Cytidin, 2'-deoxy Inosin, 2'-deoxy Uridin sowie die unnatürlichen Basen Nebularin, Nitropyrrol und 5-Nitroindole.

[0032] Es gibt auch weitere 3' und 5' Modifikationen, die vor Nukleaseabbau schützen, wie primäre, sekundäre oder tertiäre Amine, die ebenso wie Hydroxyl- und Thiol-Gruppen über aliphatische oder durch Sauerstoff "O", Schwefel "S" bzw. Stickstoff "RR'R"N" modifiziert aliphatische Linker an terminalen Phosphatgruppen (3' bzw. 5' Phosphat) hängen, verzweigte und unverzweigte Ethylenglykole, genauso wie Glycerin Derivate. Eingesetzt werden können auch endständige Markierungen wie Biotin, Dinitrophenol, und Digoxigenin sowie alle handelsüblichen Farbstoffe, die unmittelbar als Phosphoramidite bzw. mittelbar als Aktivester erhältlich sind.

[0033] In der Regel wird eine erste Cap-Struktur durch das erste Basis-DNA-Oligonukleotid eingeführt, eine weitere Cap-Struktur durch das n-te-Basis-DNA-Oligonukleotid. Theoretisch wäre es auch denkbar, daß weiter innen liegende Basis-DNA-Oligonukleotide eine Cap-Struktur umfassen, dies ist aber nicht bevorzugt.

[0034] Das Reaktionsprodukt der Exonukleasebehandlung ist einzelsträngige DNA mit Cap-Strukturen an ihren Enden. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung kann diese einzelsträngige DNA durch PCR in doppelsträngige DNA überführt und vermehrt werden. Dazu werden vorzugsweise Primer verwendet, deren Zielsequenzen im 5'-terminalen Bereich bzw. im 3'-terminalen Bereich der gewünschten DNA-Sequenz liegen. Die Zielsequenzen liegen üblicherweise im Bereich des ersten bzw. letzten Basis-DNA-Oligonukleotids. Durch die Primer können auch Restriktionsschnittstellen an den Endbereichen der doppelsträngigen DNA eingeführt werden, die Primer enthalten dann eine Erkennungssequenz für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen. Das so hergestellte doppelsträngige DNA-Produkt kann durch Restriktionsenzyme entsprechend verdaut werden und beispielsweise in ein Plasmid oder einen Vektor kloniert werden. Die DNA kann dann in eine Zelle eingeführt werden. Dadurch kann die so hergestellte DNA beispielsweise in Bakterien vermehrt werden. Derartige Techniken sind dem Fachmann bekannt. Die DNA kann auch in eukaryontische Zellen, z. B. Säugerzellen eingeführt werden, um gewünschte Polypeptide zu exprimieren.

[0035] In einer besonderen Ausführungsform enthalten ein oder mehrere Basis-DNA-Oligonukleotide und/oder Scharnier-DNA-Oligonukleotide randomisierte Nukleotide. Dadurch kann DNA hergestellt werden, die an bestimmten Stellen Variationen aufweist. Der Einbau solcher Variationen in eine Sequenz erfolgt bereits während der Oligonukleotidsynthese. Durch Verwendung von DNA-Phosphoramiditmischungen, die anstatt der einzelnen Phosphoramidite sämtliche Basen (dA, dC, dG und dT) in einem bestimmten Verhältnis enthalten (N-Mischungen), gelangt man zu partiell oder vollständig randomisierten Oligonukleotiden. Diese Oligonukleotide können über das hier beschriebene Verfahren zu kompletten Genen vervollständigt werden und liefern, eingebaut in die entsprechenden Vektoren, die gewünschten Protein- oder Peptidbibliotheken. Solche Bibliotheken sind die Grundlage für die Suche nach bestimmten, neuen Eigenschaftsmustern. Bei Zumischung einer N-Mischung zu den einzelnen Monomeren (XN-Mischungen) besteht darüber hinaus die Möglichkeit, den Grad der Randomisierung einzuschränken. Hierdurch wird gewährleistet, daß die Variationsbreite innerhalb einer Protein- bzw. Peptidbibliothek im Verhältnis zum Ausgangsgen klein bleibt. Diese Strategie verhindert, daß entstandene positive Mutationen durch Überlagerung mit weiteren Mutationen in der Protein- oder Peptidbibliothek unterdrückt werden oder verlorengehen.

[0036] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist DNA, die durch das beschriebene Verfahren erhältlich ist, insbesondere

solche, die durch das Verfahren hergestellt wurde. Die Erfindung betrifft außerdem ein DNA-Hybrid, das einen DNA-Einzelstrang, einen oder mehrere damit hybridisierende Scharnier-DNA-Oligonukleotide sowie wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt.

[0037] Die Erfindung betrifft auch ein Kit, das geeignet ist zur Durchführung des Verfahrens. Das erfindungsgemäße Kit enthält ein erstes Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein weiteres Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein Enzym mit Ligaseaktivität und ein Enzym mit Exonukleaseaktivität. Das Kit kann außerdem Reagenzien enthalten, die zur Durchführung eingesetzt werden können, z. B. konzentrierte Pufferlösungen.

[0038] Das Kit kann darüberhinaus Mittel zur Durchführung einer PCR enthalten. Derartige Mittel können Primer und eine thermostabile DNA-Polymerase sein. Die Primer enthalten vorzugsweise eine oder mehrere Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen.

[0039] Das vorliegende Verfahren zur chemoenzymatischen Totalsynthese von Genen (vgl. Figur 2) zeichnet sich durch zahlreiche Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren aus:

[0040] Es erlaubt die totalsynthetische Konstruktion von Genen auf Basis besonders langer Basis-DNA-Oligonukleotide (45-1000 Basen). Eine Gegenstrangsynthese entfällt, was den Zeitaufwand und die Kosten zum Aufbau von Genen oder Genklustern deutlich reduziert. Im Vergleich zu anderen Gensynthesestrategien kommt man ohne die zeitaufwendige Zwischenklonierung von Genfragmenten aus. Zudem erlaubt der Aufbau lediglich eines Stranges die Einführung von Mutationen auf DNA-synthetischer Ebene. Mutagenisierte oder randomisierte Abschnitte können so an beliebiger Stelle des Gens generiert und bei der Gegenstrangsynthese (PCR) vervollständigt werden. Schwierigkeiten bei der Hybridisierung randomisierter Sequenzen entfallen hierdurch.

[0041] Eine Besonderheit des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Verwendung von Cap-Strukturen, insbesondere von 5' und 3' Überhängen, zur *in vitro* Selektion von Ligationsprodukten. Solche Cap-Strukturen bestehen aus 3' bzw. 5' Nukleaseresistenzen, die durch Polymerasen oder Enzyme mit Nukleaseaktivität (5' → 3' sowie 3' → 5') nicht verkürzt werden können. Das nach der Ligation aufgebaute Vollängenprodukt ist an beiden Enden vor Nukleaseabbau geschützt, alle kürzeren Zwischenprodukte oder eingesetzte Oligonukleotide, einschließlich der endständigen Oligonukleotide jedoch nicht. Dadurch wird das nach Nukleasebehandlung an beiden Enden geschützte Vollängenprodukt im Reaktionsansatz selektiert bzw. stark angereichert. Die sich üblicherweise anschließende PCR liefert das gewünschte doppelsträngige Genprodukt.

[0042] Die Synthese- und Aufreinigungsprotokolle können so modifiziert werden, dass besonders lange Oligonukleotide in hoher Qualität und Exaktheit erhalten werden können. Zudem erlaubt der Einsatz eines speziellen Phosphorylierungsreagenzes die Abtrennung ausschließlich terminal modifizierter Basis-DNA-Oligonukleotide, was die oligonukleotidspezifische Ligation (OSL) sehr effizient gestaltet.

[0043] Bereits beim Aufbau der Oligonukleotide können Faktoren, wie beispielsweise die Codon Usage auf den jeweiligen Wirt optimal angepasst werden, was die Expression heterologer Proteine teilweise erst ermöglicht.

[0044] Der Zusammenbau des Zielgens oder -clusters erfolgt enzymatisch mit Hilfe von kurzen komplementären Oligonukleotiden (Scharniere), die als Ligationsmatrizen fungieren. Dadurch entfällt die Notwendigkeit eines kompletten Gegenstranges zur spezifischen Ligation der Basis-DNA-Oligonukleotide. Eine unerwünschte Einflussnahme dieser Scharniere in der nachfolgenden PCR kann durch die Verwendung von 3'Phosphatgruppen, die sich enzymatisch nicht verlängern lassen, unterbunden werden.

[0045] Für die OSL können neben den üblichen Ligasen wie z.B. die T4 DNA Ligase (16°C bis 37°C) auch thermostabile Ligasen wie z.B. *Taq* oder *Pfu* DNA Ligase (37°C-80°C) eingesetzt werden. Dadurch gelingt es häufig optimale Ligationsbedingungen ausfindig zu machen.

[0046] Die Totalsynthese von Zielgenen mit Hilfe des hier vorgestellten Verfahrens ermöglicht neue Möglichkeiten beim Aufbau von Genbibliotheken:

- i) Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren oder Sequenzabschnitte auf DNA-synthetischer Ebene vollständig randomisiert und somit in das Gen eingebracht werden.
- ii) Andernfalls gelingt es mit Hilfe dieser Technologie auch "eingeschränkt-randomisierte" Sequenzen zu generieren, die beispielsweise lediglich hydrophobe Aminosäuren zulassen, im Gen zulassen (z.B. NTN).

[0047] Figur 1A und 1B zeigen schematisch die Prinzipien verschiedener Verfahren zur Herstellung von DNA (siehe auch oben).

[0048] Figur 2 zeigt schematisch eine bestimmte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Es werden fünf Basis-DNA-Oligonukleotide bereitgestellt, von denen das erste und fünfte jeweils eine Cap-Struktur enthalten. Die Basis-DNA-Oligonukleotide zwei bis fünf sind 5'-terminal phosphoryliert. Als Ligationsmatrizen fungieren vier Scharnier-DNA-Oligonukleotide, die unterhalb der Übergangsstellen der Basis-DNA-Oligonukleotide gezeigt sind. Durch die Ligation werden die Basis-DNA-Oligonukleotide zu einem Einzelstrang verbunden, an den noch die Scharnier-DNA-Oligonukleotide hybridisiert sind. Diese werden aber durch die Exonuklease abgebaut, während der ligierte Einzelstrang durch die Cap-Strukturen geschützt ist. Der Einzelstrang wird durch PCR in doppelsträngige DNA überführt. Mit der

PCR wurden Schnittstellen eingeführt, so daß ein Restriktionsverdau erfolgen kann.

[0049] Figur 3 zeigt das in Beispiel 1 hergestellte Xylanasegen nach Ligation durch Taq-Ligase, Exonuklease-Behandlung und PCR-Amplifikation. Links ist ein 100bp Marker (New England Biolabs) aufgetragen, rechts 10µl des Amplifikationsansatzes auf einem 2%igen Agarosegel in 1xTBE.

[0050] Figuren 4A und 4B zeigen die durch DNA-Sequenzierung ermittelte Nukleotidsequenz der in Beispiel 1 hergestellten DNA nach Klonierung in den Vektor pET23a. Die ermittelte Sequenz des Xylanasegens stimmt mit der gewünschten Sequenz überein.

[0051] Figur 5 zeigt die in Beispiel 2 hergestellte Chymotrypsinogen A-DNA nach Ligation durch Taq-Ligase, Exonuklease-Behandlung und PCR-Amplifikation. Links ist ein 100bp Marker (New England Biolabs) aufgetragen, rechts 10µl des Amplifikationsansatzes auf einem 1.5%igen Agarosegel in 1xTBE.

[0052] Figuren 6A und 6B zeigen die durch DNA-Sequenzierung ermittelte Nukleotidsequenz der in Beispiel 2 hergestellten DNA nach Klonierung in den Vektor pET23a. Die ermittelte Sequenz des Gens für Chymotrypsinogen A stimmt mit der gewünschten Sequenz überein.

[0053] Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1: Synthese des Xylanase Gens aus *A. kawachii*

Herstellung

1. ODN-Synthese

[0054] Die Synthese sämtlicher Oligonukleotide (ODN) erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode an einem Expedite 8909 Synthesizer (ehem. Perseptive Biosystems). Alle verwendeten Chemikalien wurden über die Firma Proligo (Hamburg) bezogen. Die verwendeten Amidite wurden in trockenem Acetonitril (Proligo) aufgenommen (alle Bausteine, einschließlich des Phosphorylierungsreagenzes, in einer Endkonzentration von 0.1 M) und vor Ihrem Einsatz über aktiviertem Molekularsieb (Merck) getrocknet. Um eine möglichst effiziente Synthese von besonders langen Oligonukleotiden zu ermöglichen, wurden alle Kupplungszeiten auf 3 Minuten verlängert. Als Aktivator für die Kupplungsreaktion diente Dicyanoimidazol (Proligo). Das verwendete CPG-Trägermaterial wies dabei eine Porenweite von 1000Å (Länge <130bp, Proligo) bzw. O 2000Å (Länge > 130bp, Glen Research) auf. Um möglichst vollständig 5'-phosphorylierte ODN's zu erhalten, wurde nach der DMTr-on Synthese das 5' Ende mit Hilfe von [3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)-2,2'-dicarboxyethyl]propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N'-diisopropyl)-phosphoramidit (CPR11, Glen Research) umgesetzt. Um auch in diesem Fall eine entsprechend hohe Kupplungsausbeute zu erhalten, wurden die Kupplungszeiten für diese Verbindung auf 30 Minuten verlängert. Insgesamt wurden so für die Xylanase 7 ODN's (Xyl1-Xyl7), darunter 6 5'-terminal phosphorylierte (Xyl2-Xyl7), mit einer durchschnittlichen Länge von 70-90b aufgebaut (Tabelle 1). Für die Synthese der Scharnier-DNA-Oligonukleotide (Übergangsstücke ÜXyl1-6) wurden die Syntheseprotokolle nicht weiter modifiziert.

2. Aufreinigung

[0055] Nach der Synthese erfolgte die Entschützung der Basenschutzgruppen. Hierzu wurde das Trägermaterial (etwa 7mg CPG) in ein verschraubbares Gefäß überführt und 24h bei 37°C mit einer Lösung (500µl) bestehend aus drei Teilen 32%igem Ammoniak (Merck) und einem Teil abs. Ethanol (Fluka) behandelt. Nach erfolgter Abspaltungsreaktion läßt man den Ansatz auf Eis abkühlen und versetzt die Mischung mit 100µl einer 1M Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA). Die gesamte Probe wird anschließend durch Filtration vom Trägermaterial befreit und über RP-HPLC aufgereinigt (Säule: 4.6mm x 300mm gepackt mit POROS R2 (Perseptive Biosystems); Puffer A: 100mM TEAA, 5% Acetonitril; Puffer B: Acetonitril; Fluß: 4ml/min; Gradient: 40 Säulenvolumina von 0% bis 50% Puffer B). Die Hauptfraktionen wurden aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Nach Detritylierung mit 80% Essigsäure (30 Minuten bei 22°C) wurde die Essigsäure unter Vakuum abgezogen und der verbliebene Rückstand zur Abspaltung der Phosphatenschutzgruppe 15 Minuten mit 300µl wässriger Ammoniaklösung (2 Teile dest. Wasser/konz. Ammoniak) behandelt. Da das erste Basis-DNA-Oligonukleotid Xyl1 keine terminale Modifikation (5' Phosphat) aufweist, entfiel die basische Behandlung. Anschließend wurden die fertig entschützten Oligonukleotide mit Ethanol gefällt, in dest. Wasser aufgenommen und über denaturierende PAGE (15%) analysiert. Die Sichtbarmachung der Oligonukleotide erfolgte durch Silberfärbung. Verkürzte Sequenzen konnten hierbei für alle Oligonukleotide nicht nachgewiesen werden.

3. Gensynthese (Überblick)

[0056] Die Gensynthese läßt sich in zwei Teilschritte unterteilen. Zunächst findet ein Ligationsschritt statt, bei dem die Basis-DNA-Oligonukleotide (Xyl1-Xyl7, Tabelle 1) nach Hybridisierung an die kurzen Scharnier-DNA-Oligonukleoti-

de (Übergangsstücke ÜXyl1-ÜXyl6) mit Hilfe einer Ligase (z.B. *Taq*-Ligase, T4-DNA-Ligase oder *E. coli* Ligase) miteinander verknüpft werden. Dieser Teilschritt wird hier allgemein als oligonukleotidspezifische Ligation (OSL) bezeichnet. Nach der OSL wird der gesamte Reaktionsansatz mit Exonuklease VII behandelt. Hierbei werden sämtliche nicht-eingebauten Oligonukleotide, einschließlich der Scharnier-DNA-Oligonukleotide hydrolysiert. Ein kleiner Teil des Hydrolyseansatzes wird anschließend in einer PCR mit zwei terminal zu den ODN's Xyl1 und Xyl7 bindenden Primern (APXyl1 und APXyl7), eingesetzt. Diese Reaktion liefert spezifisch das Xylanase Gen und ermöglicht gleichzeitig durch die mit APXyl1 sowie APXyl7 eingeführten Linkersequenzen eine Klonierung in ein entsprechendes Plasmid.

4. Oligonukleotidspezifische Ligation (OSL)

[0057] Für die TSL wurden je 2 µl der ODN's Xyl1-Xyl7 (10 µM) sowie 10 µl der Scharnier-DNA-Oligonukleotide ÜXyl1-ÜXyl6 (10 µM) in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 8.2 µl 10xLigase Puffer (New England Biolabs) vermischt und mit 2 µl (80U) *Taq*-DNA Ligase (New England Biolabs) versetzt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C für 12-14h.

Tabelle 1. Oligonukleotide zum Aufbau des Xylanasegens.

Name	Sequenz (von 5' in 3')	Modifikation
Xyl1	*a*g*g*c*aaatgggaattccatatgagtgtggttaactacgtgc*aaactacaacggcaaccttgctgattcacctatgacgagagtgcogga	Keine
Xyl2	acattttccatgtactgggaagatggagtggagctccgactttgtcgttggtctgggctggaccactgggtcttcgaatgctatcagctactctg	5' Phosphat
Xyl3	ccgaatacagtgcttctggctcctcttctacctcgtgtgtacggctgggttaactatcctcaggctgaatactacatcgtc	5' Phosphat
Xyl4	gaggattacgggtgattacaaccttgacgctcggccacaagccttggtaccgtgtactctgatggaagcacctaccaagtctgcac	5' Phosphat
Xyl5	cgacactcgaactaacaacacatcgaatcaggggaacaagcagcttcacgcagctactctccgttcgagagagcacgcgcacatctg	5' Phosphat
Xyl6	gaacgggtgactgttccaaccatttcaacttctgggccagcagtggttcgggaattccgacttcaaita	5' Phosphat
Xyl7	tcagggtcatggcagtggaagcatggagcggcgccggcagcgcagtgctacgatcctctaaactcagcgggaat*a*a*t*t	5' Phosphat
ÜXyl1	gtacatggaaaatgttcgggcactctcgtc	Keine
ÜXyl2	aagcactgtattcggcagagtagctgatalg	Keine
ÜXyl3	atcaccgtaatcctcgcagatgtagtattc	Keine
ÜXyl4	ttagttcagtgctcgggtcagacttgglag	Keine
ÜXyl5	caacagtcaccgttccagatgtcgcggtgc	Keine
ÜXyl6	actgccatgacctgataattgaagtcgcta	Keine
APXyl1	aattgggaattccatatg	Keine
APXyl7	aaitaattccgctcgagt	Keine
* Phosphorthioatbindungen		

5. Exonukleasebehandlung

[0058] Der gesamte Ligationsansatz wurde zunächst mit 50 µl 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 500 µl abs. Ethanol auf Eis gefällt. Der Rückstand wird nach der Fällung unter Vakuum getrocknet und in 50 µl dest. Wasser gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 50 µl Exonuklease VII (20U, Pharmacia Biotech) in 100mM Tris-HCl pH8.0, 400mM NaCl zugegeben und das Ganze 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Nukleaseansatz wurde anschließend 1 x mit Phenol-Chloroform bzw. 2 x mit Chloroform ausgeschüttelt und der wässrige Überstand in ein steriles Cap überführt.

6. PCR

[0059] Zur gezielten Amplifikation des so aufgebauten, einzelsträngigen Gens wurde 2 µl des Nukleaseansatzes mit je 10 µl der Außenprimer APXyl1 (10 µM) und APXyl7 (10 µM), 8 µl dNTP-Mix (1,25mM/dNTP), 5 µl 10x Polymerase Puffer (New England Biolabs) und 13 µl dest. Wasser versetzt, vermischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach wurde die Mischung auf Eis abgeschreckt, mit 2 µl (4U) Vent Polymerase (New England Biolabs) versetzt und bei 40°C

(Anlagerung) in den Thermocycler (Hybaid) gestellt. Die anschließende Amplifikation des Xylanasegens erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 2:

PCR-Bedingungen		
Schritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung	40°C	30sec
Verlängerung	72°C	1min
Denaturierung	95°C	30sec
Zyklenzahl 35		

[0060] Nach Ablauf der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 5x Probenpuffer versetzt und über Gelelektrophorese (3% Agarose) aufgereinigt (Figur 3). Die Isolierung des Xylanase Gens erfolgte nach Elektroelution der aus dem Gel ausgeschnittenen Agarosebande (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

7. Klonierung

[0061] Das nach Elution und Extraktion (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual) in TE Puffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA pH8.0) aufgenommene Xylanase Gen wurde vollständig mit den Restriktionsenzymen NdeI (New England Biolabs) und XhoI (New England Biolabs) über Nacht bei 37°C verdaut und über Gelelektrophorese erneut isoliert. Nach Elektroelution und Aufarbeitung des Fragmentes wurde dieses über Nacht bei 16°C in den entsprechend geöffneten pET23a Vektor (Novagen) einligiert. Zur Ligation wurden 200U T4 DNA Ligase eingesetzt. 5µl des Ligationsansatzes wurden anschließend in kompetente Zellen (DH5α) transformiert (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

8. Sequenzierung

[0062] Die durchgeführte Sequenzierung nach Saenger bei einem willkürlich isolierten Klon, erbrachte die vollständige Übereinstimmung mit der entworfenen Sequenz (Figur 4A und 4B).

Beispiel 2: Synthese des Gens für humanes Chymotrypsinogen A

1. ODN Synthese

[0063] Die Synthese sämtlicher Oligonukleotide (ODN) erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode an einem Expedite 8909. Alle verwendeten Chemikalien und Syntheseprotokolle entsprechen den Angaben aus Abschnitt 1 von Beispiel 1. Zum Aufbau der Chymotrypsinogen-DNA wurden insgesamt 11 ODN's (Ch1-Ch11), darunter 10 5'-terminal phosphorylierte (Ch2-Ch11), mit einer durchschnittlichen Länge von 90b aufgebaut (Tabelle 3). Auch in diesem Beispiel wurden die Syntheseprotokolle zur Synthese der kurzen Übergangsstücke (ÜCh1-10) nicht weiter modifiziert.

2. Aufreinigung

[0064] Nach der Synthese erfolgte die Entschützung der Basenschutzgruppen. Hierzu wurde das Trägermaterial (etwa 7mg CPG) in ein verschraubbares Gefäß überführt und 24h bei 37°C mit einer Lösung (500µl) bestehend aus drei Teilen 32%igem Ammoniak (Merck) und einem Teil abs. Ethanol (Fluka) behandelt. Nach erfolgter Abspaltungsreaktion läßt man den Ansatz auf Eis abkühlen und versetzt die Mischung mit 100µl einer 1M Triethylammoniumacetatlösung (TEAA). Die gesamte Probe wird anschließend durch Filtration vom Trägermaterial befreit und über RP-HPLC aufgereinigt (Säule: 4.6mm x 300mm gepackt mit POROS R2 (Perseptive Biosystems); Puffer A: 100mM TEAA, 5% Acetonitril; Puffer B: Acetonitril; Fluß: 4ml/min; Gradient: 40 Säulenvolumina von 0% bis 50% Puffer B). Die Hauptfraktionen wurden aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Nach Detritylierung mit 80%iger Essigsäure (30 Minuten bei 22°C) wurde erneut bis zur Trockene einrotiert und zur Abspaltung der Phosphatschutzgruppe der Rückstand 15 Minuten mit 300µl wässriger Ammoniaklösung (2 Teile dest. Wasser/konz. Ammoniak) behandelt. Anschließend wurde das fertig entschützte Oligonukleotid mit Ethanol gefällt, in dest. Wasser aufgenommen und über denaturierende PAGE analysiert.

Tabelle 3 Oligonukleotide zum Aufbau des Gens für Chymotrypsinogen A.

4. Oligonukleotidspezifische Ligation (OSL)

5. Exonukleasebehandlung

[0067] Entsprechend Beispiel 1 wurde der gesamte Ligationsansatz zunächst mit 50µl 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 500µl abs. Ethanol auf Eis gefällt. Der Rückstand wird nach der Fällung unter Vakuum getrocknet und in 50µl dest.

Wasser gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 50µl Exonuklease VII (20U) in 100mM Tris-HCl pH8.0, 400mM NaCl zugegeben und das Ganze 45Minuten bei 37°C inkubiert. Der Nukleaseansatz wurde anschließend mit Phenol-Chloroform bzw. Chloroform ausgeschüttelt und der wässrige Überstand in ein steriles Cap überführt.

6. PCR

[0068] Zur Amplifikation des über OSL zusammengebauten Gens wurde 2µl des Nukleaseansatzes mit je 10µl der Außenprimer APCh1 (10µM) und APCh11 (10µM), 8µl dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 5µl 10xPolymerase-Puffer (New England Biolabs) und 13µl dest. Wasser versetzt, vermischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach wurde die Mischung auf Eis abgeschreckt, mit 2µl (4U) Vent Polymerase (New England Biolabs) versetzt und bei 54°C (Anlagerung) in den Cycler (Hybaid) gestellt. Die Amplifikation des Chymotrypsinogen-Gens erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 4:

PCR-Bedingungen		
Schritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung	54°C	30sec
Verlängerung	72°C	1.5min
Denaturierung	94°C	30sec
Zykluszahl 35		

[0069] Nach Ablauf der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 5xProbenpuffer versetzt und über Gelelektrophorese (1.5% Agarose) aufgereinigt (Figur 5). Die Isolierung der Chymotrypsinogen-DNA erfolgte nach Elektroelution der aus dem Gel ausgeschnittenen Agarosebande (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

7. Klonierung

[0070] Die nach Elution und Extraktion (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual) in TE Puffer (10mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA pH8.0) aufgenommene Chymotrypsinogen-DNA wurde vollständig mit den Restriktionsenzymen NdeI (New England Biolabs) und XhoI (New England Biolabs) über Nacht bei 37°C verdaut und über Gelelektrophorese erneut isoliert. Nach Elektroelution und Aufarbeitung des Fragmentes konnte dieses über Nacht bei 16°C in den entsprechend geöffneten pET23a Vektor (Novagen) einligiert werden. Zur Ligation wurden 200U T4 DNA Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. 10µl des Ligationsansatzes wurden anschließend in kompetente Zellen (DH5α) transformiert (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

8. Sequenzierung

[0071] Die durchgeführte Sequenzierung nach Saenger bei einem willkürlich isolierten Klon erbrachte die vollständige Übereinstimmung mit der entworfenen Sequenz (Figur 6A und 6B).

Zitierte Veröffentlichungen

[0072]

- Au, L.C. et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 248,200-203
 Ausubel, F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, Vol.I, Wiley
 Casimiro, D.R. et al. (1997) Structure, 5,1407-1412
 Chalmers, F.M. & Curnow, K.M. BioTechniques, 30,249-252
 Chang, H.H. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., 190,242-249
 Chen, H.B. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 871-878
 Ciccarelli, R.B. et al. (1991) Nucl. Acids Res., 19,6007-6013
 Climie, S. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87,633-637
 Dillon, P.J. & Rosen, C.A. (1990) BioTechniques, 9,298-300
 Ferretti, L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 83,599-603
 Hostomsky, Z. et al. (1987) Nucl. Acids Res., 15,4849-4856
 Jayaraman, K. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 88,4084-4088

Jayaraman, K. & Puccini, C.J. (1992) *BioTechniques*, 12, 392-398
Oprian, D.D. et al. (1991)
Biochemistry, 30, 11367 -11372
Spat, B.S. et al. (1985) *Nucl. Acids Res.*, 13,2959-2977
5 Traub, P.C. et al. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2001),55,198-204
Uhlmann, E. & Hein, F. (1987) *NucleicAcids Symp Ser*, 18,237-240
Wosnick, M.A. (1989) *Gene*, 76,153-160
Ye, Q.Z. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186,143-149

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH

<120> Verfahren zur Herstellung von DNA

<130>

<140>

<141>

<150>

<151>

<160> 42

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 96

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 1

taggcaaatt gggaattcca tatgagtgt ggtattaact acgtgcaaaa ctacaacggc 60

aacctgtgt attcaccta tgacgagagt gccgga 96

<210> 2

<211> 94

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 2

acattttcca tgtactggga agatggagtg agctccgact ttgtcgttg tctgggctgg 60

accactgggt cttcgaatgc taccagctac tctg 94

<210> 3

<211> 83

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

5 <400> 3

ccgaatacag tgcttctggc tctcttcct acctcgctgt gtacggctgg gtaactatc 60

10 ctcaggctga atactacatc gtc 83

<210> 4

<211> 86

<212> DNA

15 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

20 <400> 4

gaggattacg gtgattacaa ccctgcagc tcggccacaa gccttggtag cgtgtactct 60

gatggaagca cctaccaagt ctgcac 86

25 <210> 5

<211> 86

<212> DNA

30 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

35 <400> 5

cgacactcga actaacgaac catcgatcac gggaacaagc acgttcacgc agtactctc 60

cgttcgagag agcacgcgca catctg 86

40 <210> 6

<211> 70

<212> DNA

45 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

50 <400> 6

gaacggtgac tgttgccaac catttcaact tctgggcca gcatgggttc gggaattccg 60

acttcaatta 70

55

<210> 7
 <211> 81
 <212> DNA
 5 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
 10 <400> 7

 tcaggatcatg gcagtggaag catggagcgg cgccggcagc gccagtgca cgatctcctc 60
 15 taaactcgag cggaattaat t . . . — . . . 81

 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
 25 <400> 8

 gtacatggaa aatgttccgg cactctcgtc 30
 30 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

 35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

 <400> 9
 40 aagcactgta ttccgcagag tagctgatag 30

 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 45 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
 50 <400> 10

 atcacccgtaa tcctcgacga ttagtatctc 30
 55 <210> 11

5	<211> 30 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
10	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 11	
	ttagttcgag tgcggtgca gacttggtag	30
15	<210> 12 <211> 30 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
20	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 12	
25	caacagtcac cgtccagat gtgcgcgtgc	30
30	<210> 13 <211> 30 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
35	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 13	
40	actgccatga cctgataatt gaagtcgcta	30
45	<210> 14 <211> 18 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	
	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 14	
50	aattgggaat tccatatg	18
55	<210> 15 <211> 18 <212> DNA <213> künstliche Sequenz	

	<220>	
5	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 15	
	aattaattcc gctcgagt	18
10	<210> 16	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
15	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 16	
20	atggctttcc tctggctcct ctctgctgg gccctcctgg gtaccacctt cggctgcggg	60
	gtccccgcca tccaccct	78
25	<210> 17	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
30	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 17	
35	gtgctcagcg gcctgtcccg catcgtgaat ggggaggacg ccgccccgg ctcttgccc	60
	tggcaggtgt ccctg	75
40	<210> 18	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
45	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 18	
50	caggacaaaa ccggctcca ctctgcggg ggctccctca tcagcgagga ctgggtggtc	60
	accgctgcc actgcggg	78
55	<210> 19	

<211> 72
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

5

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

10

<400> 19

gtccgcacct ccgacgtggg cgtagctggg gagtttgatc aaggctctga cgaggagaac 60

atccagggcc tg 72

15

<210> 20
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

20

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 20

25

aagatcgcca aggtcttcaa gaacccaag ttcagcattc tgaccgtgaa caatgacatc 60

accctgctga agctg 75

30

<210> 21
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

35

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 21

40

gccacacctg cccgttctc ccagacagtg tccgccgtgt gcctgcccag cgccgacgac 60

gacttccccg cg 72

45

<210> 22
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

50

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 22

55

	gggacactgt gtgccaccac aggctggggc aagaccaagt acaacgcaa caagaccct	60
5	gacaagctgc ag	72
	<210> 23	
	<211> 72	
	<212> DNA	
10	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
15	<400> 23 - - -	
	caggcagccc tgcccctcct gtccaatgcc gaatgcaaga agtcctgggg ccgccgcac	60
20	accgacgtga tg	72
	<210> 24	
	<211> 69	
	<212> DNA	
25	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
30	<400> 24	
	atctgtgccg gggccagtgg cgtctcctcc tgcattggcg actctggcgg tcccctggc	60
35	tgccaaaag	69
	<210> 25	
	<211> 72	
	<212> DNA	
40	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
45	<400> 25	
	gatggagcct ggaccctggt gggcattgtg tcctggggca gcgacacctg ctccacctcc	60
50	agccctggcg tg	72
	<210> 26	
	<211> 54	
	<212> DNA	
55	<213> künstliche Sequenz	

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

5

<400> 26

tacgcccgtg tcaccaagct cataccttgg gtgcagaaga tcctggctgc caac

54

10

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 27

20

caggccgctg agcacagggt ggatggcggg

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

25

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

30

<400> 28

gccggttttg tcctgcaggg acacctgcca

30

35

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

40

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 29

45

gtcggagggtg cggacccccgc agtgggcagc

30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

50

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

55

	<400> 30	
5	gaccttggcg atcttcagga cctggatgtt	30
	<210> 31	
	<211> 30	
	<212> DNA	
10	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
15	<400> 31	
	gcgggcaggt gtggccagct tcagcagggt	30
	<210> 32	
20	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
25	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 32	
30	ggcacacagt gtccccgcgg ggaagtcgtc	30
	<210> 33	
	<211> 30	
	<212> DNA	
35	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
40	<400> 33	
	gggcagggct gcctgctgca gcttgcagg	30
	<210> 34	
45	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
50	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 34	
55	ggccccggca cagatcatca cgtcggtgat	30

5	<p> <210> 35 <211> 30 <212> DNA <213> künstliche Sequenz </p>	
10	<p> <220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 35 </p>	
15	<p> ggtccaggct ccaccccttt ggcagaccag </p>	30
20	<p> <210> 36 <211> 30 <212> DNA <213> künstliche Sequenz </p>	
25	<p> <220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 36 </p>	
30	<p> ggtgacacgg gcgtacacgc cagggctgga </p>	30
35	<p> <210> 37 <211> 26 <212> DNA <213> künstliche Sequenz </p>	
40	<p> <220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 37 </p>	
45	<p> gggaattcca tatggcttc ctctgg </p>	26
50	<p> <210> 38 <211> 27 <212> DNA <213> künstliche Sequenz </p>	
55	<p> <220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA <400> 38 </p>	
	<p> ccgctcgagt tggcagccag gatcttc </p>	27
	<p> <210> 39 <211> 643 </p>	

<212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 39

10	tttccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag atatcatatg agtgctggta	60
	ttaactacgt gcaaaactac aacggcaacc ttgctgattt cacctatgac gagagtgccg	120
15	gaacatttc catgtactgg gaagatggag tgagctccga cttgtcgtt ggtctgggct	180
	ggaccactgg ttcttgaat gctatcagct actctgccga atacagtgt tctggctcct	240
	cttctacct cgctgtgtac ggctgggta actatcctca ggctgaatac tacatcgtcg	300
20	aggattacgg tgattacaac ccttcagct cggccacaag ccttggtacc gtgtactctg	360
	atggaagcac ctaccaagtc tgcaccgaca ctggaactaa cgaaccatcg atcacgggaa	420
25	caagcacgtt cagcagtagc ttctccgtt gagagagcac ggcacatct ggaacgggtga	480
	ctgttgccaa ccatttcaac ttctggggcc agcatgggtt cggaattcc gacttcaatt	540
	atcaggtcat ggcatgggaa gcatggagcg ggcgccgag cgccagtgc acgatctcct	600
30	ctaaactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgc	643

<210> 40
 <211> 643
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 40

	aaagggagat ctttattaaa acaaattgaa attcttctc tatagtatac tcacgacat	60
45	aattgatgca cgtttgatg ttgccgttg aacgactaaa gtggatactg ctctcacggc	120
	cttgtaaaag glacatgacc ctctacctc actcgaggct gaaacagcaa ccagaccgga	180
50	cctggtgacc aagaagctta cgatagtcga tgagacggct tatgtcacga agaccgagga	240
	gaaggatgga ggcacacatg ccgacccaat tgataggagt ccgacttatg atgtagcagc	300
55	tcctaagcc actaatgttg ggaacgtcga gccggtgtt ggaaccatgg cacatgagac	360

	taccttcgtg gatggttcag acgtggctgt gagcttgatt gcttggtagc tagtgccctt	420
5	gttcgtgcaa gtgcgtcatg aagaggcaag ctctctcgtg cgcgtgtaga ccttgccact	480
	gacaacgggt ggtaaagtg aagacccggg tcgtacccaa gcccttaagg ctgaagttaa	540
10	tagtccagta ccgtcacctt cgtacctcgc cgcggccgtc gcggtcacag tgctagagga	600
	gatttgagct cgtggtggtg gtggtggtga ctctaggccg acg	643
	<210> 41	
	<211> 861	
15	<212> DNÄ ⁻	
	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
20	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 41	
	ttaactttaa gaaggagata tacatatggc ttctctctgg ctctctctct gctgggccct	60
25	cctgggtacc accttcggct gcgggggtccc cgccatccac cctgtgtca gcggcctgtc	120
	ccgcatcgtg aatggggagg acgccgtccc cggctcctgg ccctggcagg tgtccctgca	180
30	ggacaaaacc ggcttcact tctgcggggg ctccctcatc agcaggact gggtggtcac	240
	cgctcccac tgcgggggtcc gcacctcca cgtggtcgta gctggtgagt ttgatcaagg	300
	ctctgacgag gagaacatcc aggtcctgaa gatcgccaag gtcttcaaga accccaagtt	360
35	cagcattctg accgtgaaca atgacatcac cctgctgaag ctggccacac ctgcccgtt	420
	ctcccagaca gtgtccgccc tgtgcctgcc cagcgccgac gacgacttcc ccgcggggac	480
40	actgtgtgcc accacaggct ggggcaagac caagtacaac gccaacaaga cccctgacaa	540
	gctgcagcag gcagccctgc cctcctgtc caatgccgaa tgcaagaagt cctggggccg	600
	ccgcatcacc gacgtgatga tctgtccgg ggccagtggc gtctctctct gcatgggcga	660
45	ctctggcggc cccctggctt gccaaaagga tggagcctgg accctggtgg gcattgtgtc	720
	ctggggcagc gacacctgtt ccacctccag cctgggcgtg tacgcccgtg tcaccaagct	780
50	cataccttgg gtgcagaaga tcttggtgtc caacctcgag caccaccacc accaccactg	840
	agatccggct gctaacaaag c	861

<210> 42

<211> 861

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

<400> 42

5	aattgaaatt cttctctat atgtataccg aaaggagacc gaggagagga cgacccggga	60
10	ggacccatgg tggaagccga cgccccaggg gcggtagggtg ggacacgagt cgccggacag	120
15	ggcgtagcac ttacccctcc tgcggcaggg gccgaggacc gggaccgtcc acagggacgt	180
20	cctgttttgg ccgaaggtga agacgcccc gagggagtag tcgtctctga cccaccagt	240
25	gcgacgggtg acgccccagg cgtggaggct gcaccagcat cgaccactca aactagttcc	300
30	gagactgtct ctctttagg tccaggactt ctagcgggtc cagaagtct tggggttcaa	360
35	gtcgtgaagac tggcacttgt tactgtagtg ggacgacttc gaccggtgtg gacgggacgaa	420
40	gaggggtctgt cacaggcggc acacggacgg gtcgaggctg ctgtgaagg ggcgcccctg	480
45	tgacacacgg tgggtgccga ccccgttctg gtcatgttg cggltgttct ggggactgtt	540
50	cgacgtctgc cgtcgggacg gggaggacag gttacggctt acgttcttca ggaccccggc	600
55	ggcgtagtgg ctgcactact agacacggcc ccggtcaccg cagaggagga cgtacccgct	660
60	gagaccgcca ggggaccaga cggtttctt acctcggacc tgggaccacc cgtaacacag	720
65	gaccccgctg ctgtggacga ggtggaggct gggaccgcac atgcgggcac agtggttcga	780
70	gtatggaacc cacgtcttct aggaccgacg gttggagctc gtggtggtgg tgggtgtgac	840
75	tctaggccga cgattgttc g	861

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von DNA, das umfasst, daß man

a) n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei

- i) das zweite bis n-te Basis-DNA-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert ist und
- ii) n wenigstens 2 ist;

b) wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, wobei für die Schar-

nier-DNA-Oligonukleotide gilt, daß der 3'-terminale Bereich eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 3'terminalen Bereich eines Basis-DNA-Oligonukleotids ist, und der 5'-terminale Bereich desselben Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 5'-terminalen Bereich des unmittelbar darauffolgenden Basis-DNA-Oligonukleotids ist, so daß im Falle der Hybridisierung eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden ein im Bereich des Scharnier-DNA-Oligonukleotids doppelsträngiges DNA-Hybrid entsteht;

c) die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in Kontakt bringt;

d) das aus Schritt c) resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterwirft;

e) das Reaktionsprodukt aus Schritt d) einer Exonukleasereaktion unterwirft, wobei der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts aus Schritt d) wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** das Reaktionsprodukt aus Schritt e) weiterhin einer PCR unterworfen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß** in der PCR ein erster Primer verwendet wird, dessen Zielsequenz im Bereich des ersten Basis-DNA-Oligonukleotids liegt, und ein zweiter Primer verwendet wird, dessen Zielsequenz im Bereich des n-ten Basis-DNA-Oligonukleotids liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, daß** in der PCR Primer eingesetzt werden, die eine oder mehrere Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen enthalten.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, daß** das doppelsträngige Reaktionsprodukt der PCR weiterhin einem Restriktionsverdau unterworfen wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Ligationsreaktion mittels einer thermostabilen Ligase durchgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Ligationsreaktion mittels einer Ligase durchgeführt wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus T4-DNA-Ligase, *Taq* DNA-Ligase und *Pfu* DNA-Ligase.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Exonukleasereaktion mittels eines Enzyms durchgeführt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Exonuklease VII, allgemein Exonukleasen, bevorzugt Exonuklease VII, jedoch auch Exonuklease I, Exonuklease III und Exonuklease V als auch DNase I sowie Mischungen der soeben beschriebenen Hydrolasen.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Cap-Struktur ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thioatbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden, 2'OMethyl-RNA, modifizierten Basen, DNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en) und RNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en).

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** das erste Basis-DNA-Oligonukleotid eine Cap-Struktur umfaßt und das n-te Basis-DNA-Oligonukleotid eine Cap-Struktur umfaßt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Basis-DNA-Oligonukleotide und/oder die Scharnier-DNA-Oligonukleotide durch die Phosphoramidit-Methode hergestellt werden.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein oder mehrere Basis-DNA-Oligonukleotide und/oder Scharnier-DNA-Oligonukleotide randomisierte Nukleotide enthalten.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die hergestellte DNA weiterhin in einen Vektor oder ein Plasmid kloniert wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß** die hergestellte DNA oder der hergestellte Vektor oder das hergestellte Plasmid in eine Zelle eingeführt wird.

14. DNA, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

15. DNA nach Anspruch 14, hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

5 16. DNA-Hybrid umfassend einen Einzelstrang, einen oder mehrere damit hybridisierende Scharnier-DNA-Oligonukleotide, eine Cap-Struktur im 5'-terminalen Bereich des Einzelstrangs und eine Cap-Struktur im 3'-terminalen Bereich des Einzelstrangs.

10 17. Kit zur Herstellung von DNA enthaltend ein erstes Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein weiteres Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein Enzym mit Ligaseaktivität und ein Enzym mit Exonukleaseaktivität.

18. Kit nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, daß** es weiterhin Mittel zur Durchführung einer PCR enthält.

15 19. Kit nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet, daß** eine thermostabile DNA-Polymerase und Primer enthält, die eine oder mehrere Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen enthalten.

20

25

30

35

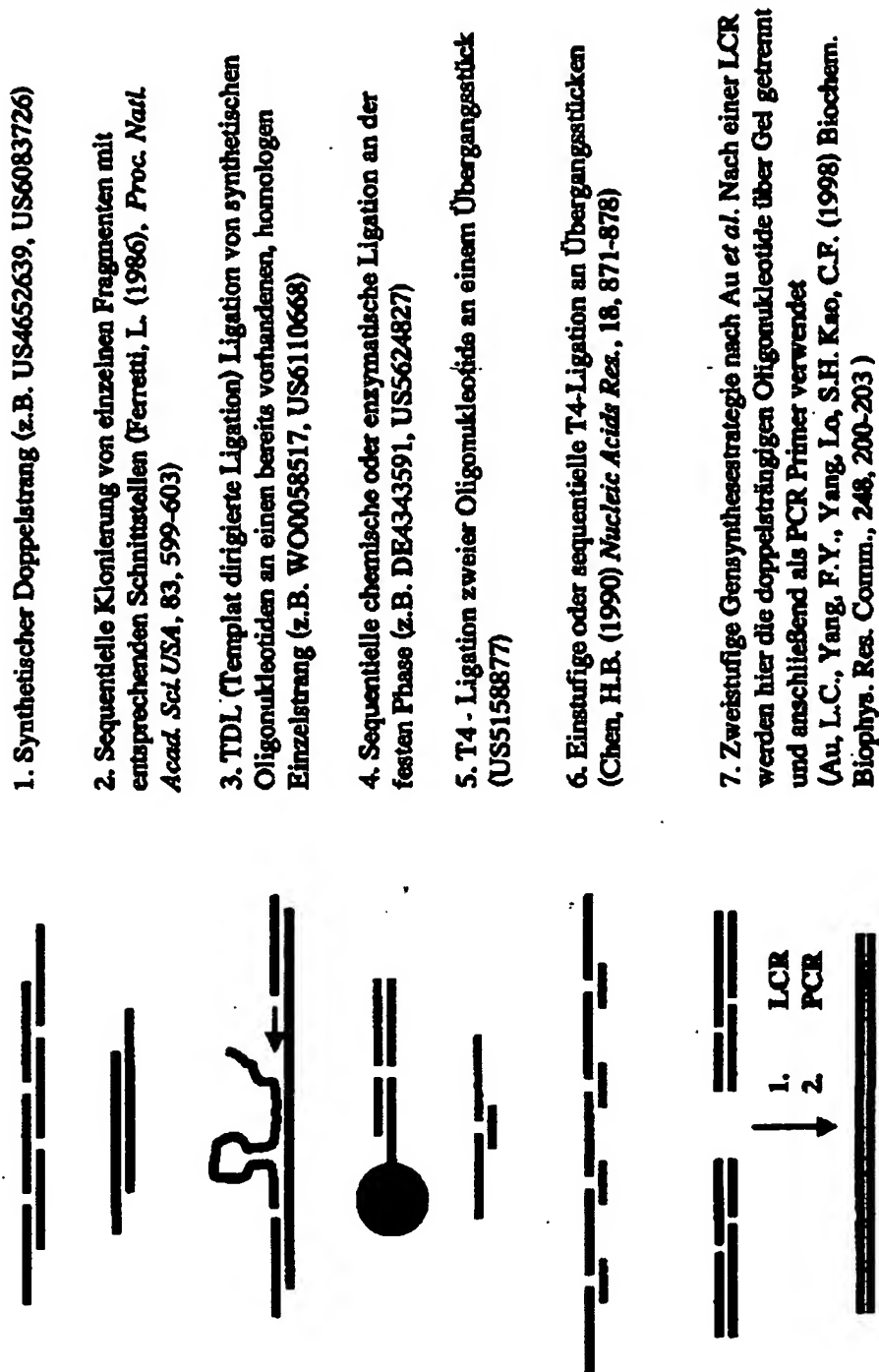
40

45

50

55

Figur 1A



Figur 1B



8. Synthetisches Oligonukleotid (140mer) mit Hairpin am 3'-Ende
(Uhlmann, E. & Hein, F. (1987) *Nucleic Acids Symp Ser.* 18, 237-240)



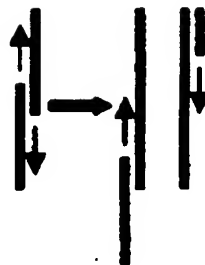
9. Synthese überlappender Oligonukleotide (Ciccarelli, R.B. et al. (1991)
Nucl. Acids Res., 19, 6007-6013)



10. Rekursive PCR (Dillon, P.J. & Rosen, C.A. (1990) *BioTechniques*, 9,
298-300)

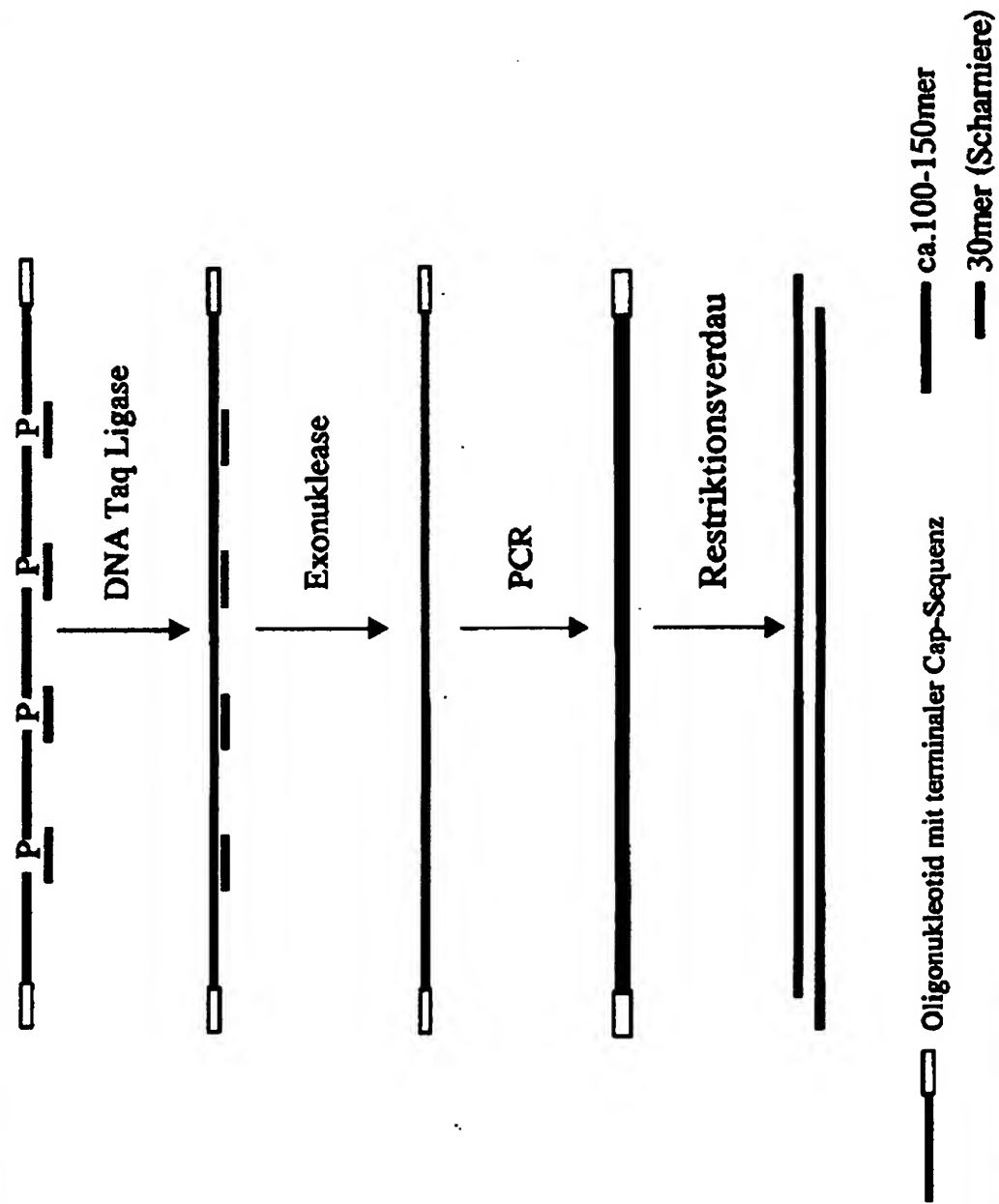


11. Doppelstrangsynthese durch PCR mit Übergangsstücken als Primern
(Yayaraman, K. & Puccini, C.J. (1992) *BioTechniques*, 12, 392-398)

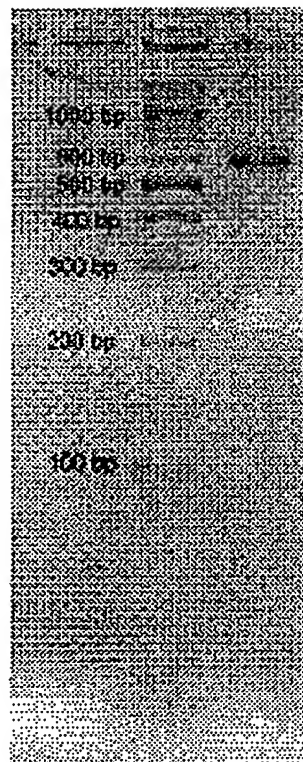


12. Sequentielle oder one-step Verlängerung von Oligonukleotiden
durch PCR (Casimiro, D.R. et al. (1997) *Structure*, 5, 1407-1412)

Figur 2



Figur 3



Figur 4A

FauNDI
 XbaI Eco32I MslI BsaAI
 tttccctctagaaataatTTTgtttaactTTtaagaaggagatatcatatgagtgtggtattaactacgtgcaaa base pairs
 aaaggagatctttattaaaaacaaattgaaattcttctctatagtatactcagaccataattgatgcacgttt 1 to 75
 EcoRV
 NdeI
 |→ Xylanase-Gen

Esp1396I
 Asp700I AccB7I
 actacaacggcaaccttgcgtgatttcacctatgacgagagtgccggaacattttccatgtactgggaagatggag base pairs
 tgatgttgccgttggaacgactaaagtggatactgctctcaggccttgtaaaaggtacatgacccttctacctc 76 to 150
 XmnI PflMI
 Van91I

Eco24I SstI AtsI Bsp119I
 AspHI FrlOI AspI Csp45I Mva1269I
 Ecl136II BanII SfuI Bpu14I
 tgagctccgactttgtcgttgggtctgggctggaccactgggttcttcgaatgctatcagctactctgccgaatata base pairs
 actcgaggctgaaacagcaaccagaccgacctgggtgaccaagaagcttacgatagtcgatgagacggcttatgt 151 to 225
 EcoICRI SacI Tth111I LspI BsmI
 Bbv12I Alw21I BstBI BsaMI
 Psp124BI BsiHKAi NspV

Bsu36I
 BcgI Ksp632I HindII CvnI
 BseRI HpaI Eco81I
 gtgcttctggctcctcttctcctacctcgctgtgtacggctgggttaactatcctcaggctgaatactacatcgctcg base pairs
 cacgaagaccgaggagaaggatggagcgacacatgccgacccaattgataggagtccgacttatgatgtagcagc 226 to 300
 Eam1104I HincII Bse21I
 EarI AocI

EcoT14I AccB1I
 StyI Asp718I
 EaeI Eco130I BshNI
 aggattacggtgattacaacccttgcagctcggccacaagccttggtagcgtgtactctgatggaagcacctacc base pairs
 tcctaagccactaatgttgggaacgtcgagccggtgttcggaaccatggcacatgagactaccttcgtggatgg 301 to 375
 CfrI ErhI Bani KpnI
 BssT1I Acc65I
 Eco64I

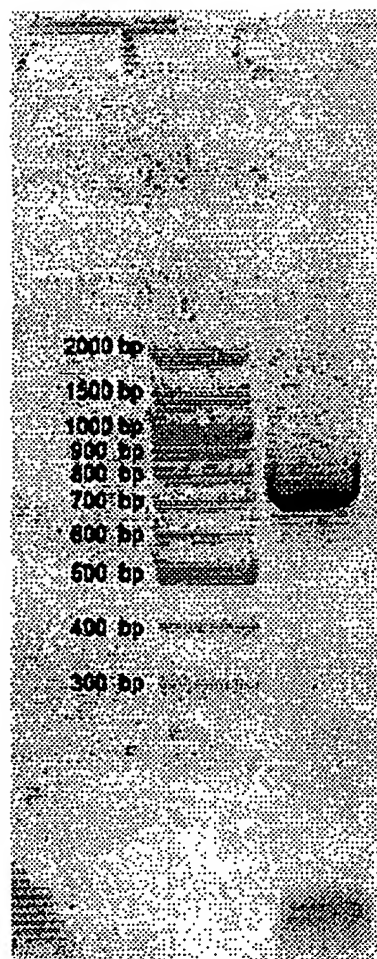
BspXI ClaI
 Bsp106I Eco255I
 BanIII Acc113I
 BsgI
 aagtctgcaccgacactcgaactaacgaaccatcgatcacgggaacaagcacgttcacgcagtacttctccgttc base pairs
 ttcagacgtggctgtgagcttgattgcttggttagctagtgcccttggttcgtgcaagtgcgtcatgaagaggcaag 376 to 450
 BspDI BseCI ScaI
 Bsa29I
 BscI Bsu15I

Figur 4B

Alw21I
 AspHI
 gagagagcagcgccacatctggaacgggtgactgttgccaaccatttcaacttctgggccagcatgggttcggga base pairs
 ctctctcgtgcgcgtgtagaccttgccactgacaacgggttgtaaagtgaagaccgggtcgtaccaagccct 451 to 525
 Bbv12I
 BsiHKA1
 BanII
 Eco24I
 Bsp120I
 PspOMI
 FrioI
 ApaI
 ApoI
 AcsI
 EcoRI
 MspI
 AccB1I Hsp92I MroNI Cfr10I NaeI
 KasI Hin1I BstD102I Bse118I HaeII
 Eco64I BbiII AcyI BsrFI BstH2I
 attccgacttcaattatcaggtcatggcagtggaagcatggagcggcgccggcagcgccagtggtcacgatctcct base pairs
 taaggctgaagttaatagtcagttaccgtcaccttcgtacctcgccgcggcgccgtcgcggtcacagtgctagagga 526 to 600
 BanI BsrBI NarI NgoMI HaeII Bsp143II
 BshNI Msp17I EheI NgoAIV BbeI
 AccBSI BsaHI BssAI Bsp143II BstH2I
 XhoI PaeR7I
 Sfr274I BsiHKA1 MflI
 BseRI Eco88I Alw21I BstYI
 ctaaactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgc base pairs
 gatttgagctcgtggtggtggtggtgactctaggccgacg 601 to 643
 AvaI AspHI BstX2I
 Ama87I Bbv12I XhoII
 BcoI BsoBI
 → Ende Xylanase-Gen im Anschluss (His)₆-Tag

Sequenz 1 Xylanasesequenzierung aus pET23a.

Figur 5



Figur 6A

Eco24I Asp718I
 EcoO109I BanI KpnI
 FauNDI BseRI Bsp120I Eco64I
 ttaactttaagaaggagatatatatggctttcctctggctcctctcctgctgggccctcctgggtaccacctt base pairs
 aattgaaattcttctctatatgtataaccgaaaggagaccgaggagaggacgacccgggaggacccatggtggaa 1 to 75
 NdeI PspOMI BanII AccBII
 DraII ApaI BshNI
 FriOI Acc65I
 Bsp1720I BsaHI
 CelII BsiHKAII BbiII AtsI
 DraIII Bbv12I HinII AspI
 PpuMI
 cggtgcgggggtccccgccatccaccctgtgctcagcggcctgtcccgcatcgtgaatggggaggagcgcctccc base pairs
 gccgacgccccaggggcggttaggtgggacacgagtcgcccggacagggcgtagcacttaccctcctgcggcagg 76 to 150
 EcoO109I Bpu1102I MspAII Msp17I
 Psp5II BlpI Alw21I Hsp92I
 AspHI NspBII AcyI Tth111I
 SbfI Cfr10I
 BstSFI BsrFI BanII
 BspMI Sse8387I Eco24I
 cggtcctcctggccctggcagggtgtccctgcaggacaaaaccggcttccacttctgcgggggctccctcatcagcga base pairs
 gccgaggaccgggaccgtccacaggagctcctgttttggccgaaggtgaagacgccccgaggagtagtcgct 151 to 225
 SfcI BssAI FriOI
 PstI Bse118I
 EcoO65I
 BstEII AtsI Ksp22I
 DrdI NspBII Tth111I FbaI
 ggactgggtgggtcaccgctgcccactgcgggggtccgcacctccgacgtgggtcgtagctgggtgagtttgatcaagg base pairs
 cctgaccacacagtggtggcaggggtgacgccccaggcggtggagggtgcaccagcatcgaccactcaaactagttcc 226 to 300
 Eco91I MspAII AspI BclI
 BstPI
 PspEI
 AlwNI BssTII
 DraII ErhI BbsI BsaMI
 BseRI PpuMI Eco57I BpuAI BsmI
 ctctgacgaggagaacatccaggtcctgaagatcgccaaggtcttcaagaacccaagttcagcattctgaccgt base pairs
 gagactgtcctctttaggtccaggacttctagcgggtccagaagttcttgggggttcaagtcgtaagactggca 301 to 375
 EcoO109I Eco130I Bbv16II Mva1269I
 Psp5II StyI BpI
 EcoT14I
 MluNI
 CfrI AtsI
 Eco57I BspMI Tth111I
 gaacaatgacatcacctgtgtaagctggccacacctgcccgcttctcccagacagtgtccgctgtgcctgcc base pairs
 cttgttactgtagtgggacgacttcgaccggtgtggacggggaagagggtctgtcacaggcggcacacggacgg 376 to 450
 EaeI AspI
 MscI
 BalI

•

•

•



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 02 00 0720

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	WO 01 57269 A (ILLUMINA INC) 9. August 2001 (2001-08-09)	1-3, 6-12, 15-17	C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34
Y	* Seite 17, letzter Absatz - Seite 19, erster Absatz; Seite 23 zweiter Absatz - fünfter Absatz; Abbildung 8 *	4,5,13, 14,20	
X	WO 00 63437 A (ILLUMINA INC) 26. Oktober 2000 (2000-10-26)	1-3, 6-12, 15-17	
Y	* Seite 24, Zeile 20 - Seite 26, Zeile 7; Seite 34, Zeile 22 - Seite 35, Zeile 33; Seite 64, Zeile 1 - Zeile 12; Seite 68, Zeile 25 - Seite 69, Zeile 18; Abbildung 3 *	4,5,13, 14,20	
X	WO 94 03636 A (ABBOTT LAB) 17. Februar 1994 (1994-02-17) * Seite 18, Zeile 17 - Seite 21, Zeile 27; Seite 25, Zeile 1 - Zeile 8; Ansprüche 49-55 *	1,6-12, 15-19	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
X	WO 96 15271 A (ABBOTT LAB) 23. Mai 1996 (1996-05-23) * Seite 12, Zeile 8 - Seite 14, Zeile 28; Seite 17, Zeile 35 - Seite 18, Zeile 14; Seite 22, Zeile 12 - Zeile 19; Ansprüche 5, 6 und 9; Abbildungen 1 und 3 *	1-3, 6-12, 15-19	C12N C12P C12Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
MÜNCHEN	28. Mai 2002	Sommer, B	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 02 00 0720

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	EP 0 585 660 A (BECTON DICKINSON CO) 9. März 1994 (1994-03-09) * Seite 3, Zeile 51 - Seite 4, Zeile 46; Ansprüche 1-5 *	1,2,6-9, 11,12, 15,16	
X	JAYARAMAN K ET AL: "A PCR-mediated gene synthesis strategy involving the assembly of oligonucleotides representing only one of the strands" BIOTECHNIQUES, Bd. 3, Nr. 12, 1992, Seiten 392-398, XP001057259 ISSN: 0736-6205	15,16	
Y	Zusammenfassung; Seite 394, Spalte 2, zweiter Absatz - Seite 396, Spalte 3, zweiter Absatz;	1-14, 17-20	
X	MEHTA DEEPA V ET AL: "Optimized gene synthesis, high level expression, isotopic enrichment, and refolding of human interleukin-5." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 11, Nr. 1, 1997, Seiten 86-94, XP002199111 ISSN: 1046-5928	15,16	
Y	Zusammenfassung; Abbildung 2; Seite 87, linke Spalte, letzter Absatz - Seite 89, linke Spalte, erster Absatz	1-14, 17-20	
X	EP 0 744 470 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 27. November 1996 (1996-11-27) * Ansprüche *	15,16	
Y		1-14, 17-20	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 28. Mai 2002	Prüfer Sommer, B
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 02 00 0720

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

28-05-2002

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0157269 A	09-08-2001	AU 3806701 A	14-08-2001
		AU 3806801 A	14-08-2001
		WO 0157268 A2	09-08-2001
		WO 0157269 A2	09-08-2001
		US 2002006617 A1	17-01-2002
WO 0063437 A	26-10-2000	US 6355431 B1	12-03-2002
		AU 4476900 A	02-11-2000
		EP 1196630 A2	17-04-2002
		WO 0063437 A2	26-10-2000
WO 9403636 A	17-02-1994	AU 4687393 A	03-03-1994
		CA 2140331 A1	17-02-1994
		DE 69329824 D1	08-02-2001
		DE 69329824 T2	09-08-2001
		EP 0654093 A1	24-05-1995
		ES 2154648 T3	16-04-2001
		JP 8501212 T	13-02-1996
		US 5516663 A	14-05-1996
		WO 9403636 A1	17-02-1994
		US 5573907 A	12-11-1996
WO 9615271 A	23-05-1996	WO 9615271 A1	23-05-1996
EP 0585660 A	09-03-1994	CA 2101119 A1	18-02-1994
		DE 69328524 D1	08-06-2000
		DE 69328524 T2	31-08-2000
		EP 0585660 A2	09-03-1994
		JP 2018637 C	19-02-1996
		JP 6165678 A	14-06-1994
		JP 7057187 B	21-06-1995
EP 0744470 A	27-11-1996	AU 5233996 A	05-12-1996
		CA 2176193 A1	23-11-1996
		CN 1140762 A	22-01-1997
		EP 0744470 A1	27-11-1996
		JP 9107997 A	28-04-1997
		NO 962062 A	25-11-1996
		ZA 9604057 A	21-11-1997

EPO FORM P0451

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.